

Title	Generation of Chlamydomonas strains for robust expression of transgenes
Author(s)	DEWI KURNIASIH INDRAWAN, Sari
Citation	高知工科大学, 博士論文.
Date of issue	2016-09
URL	http://hdl.handle.net/10173/1419
Rights	
Text version	ETD



Kochi, JAPAN

<http://kutarr.lib.kochi-tech.ac.jp/dspace/>

氏 名 (本籍)	Sari Dewi Kurniasih Indrawan (インドネシア)		
学位の種類	博士 (工学)		
学位記番号	甲第 296 号		
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項		
研究科・専攻名	工学研究科・基盤工学専攻		
学位論文題目	外来遺伝子の高発現を可能にするクラミドモナス株の作出 Generation of Chlamydomonas strains for robust expression of transgenes		
論文審査	(主査) 高知工科大学 高知工科大学 高知工科大学 高知工科大学 高知工科大学 バンドン工科大学	教授 准教授 教授 准教授 教授 講師	大濱 武 有賀 修 蒲池 雄介 堀澤 栄 池 雅之 Zeily Nurachman

審査結果の要旨

1. 論文の評価

微細藻は生育が早く、しかも安い培地での培養が可能である。また、陸上植物が持つ茎や葉などの機能もなく、単純な体制であり、液体培養による大量培養も極めて容易である。そのため、バイオディーゼルや酵素、抗体などの医療用タンパクの生産の場として適していると考えられる。また、動物ウイルスの感染の可能性もない。微細藻の中でも、クラミドモナスでは効率の良い形質転換系が開発済みであり、分子生物学的な蓄積も厚い。ところが、この藻では外来遺伝子に対する転写抑制が極めて強く、導入された遺伝子由来のタンパク量は微量な場合がほとんどである。これまでも、外来遺伝子の効率的な発現を実現すべく、Fusion promoter の利用、形質転換マーカー遺伝子とのポリシストロニックな転写、コドンの適合化など、様々な工夫がなされてきたが未だ十分な発現量を達成できていない。

本研究では、真核生物の転写抑制機構に DNA のメチル化修飾が重要な役割を果たしていることに注目し、維持型 DNA メチル遺伝子の破壊株(*met1*)を宿主として利用している。まず、*met1* 株においては、野生型株よりも、外来遺伝子の発現が高い株が得られる事が確認された。次に、紫外線による *met1* 株の突然変異体のプールが作成され、形質転換効率の向上、薬剤耐性の向上をマーカーとしたスクリーニングを実行。選抜された 5 株につき、VENUS や *RSP3* 遺伝子を導入し、その発現量を Western 方により測定している。その結果、VENUS タンパクが全可溶性タンパクの 0.22% に達している形質転換体を得ている。

更に、この株について H3 ヒストン修飾量の変化を特異的抗体を用いて解析をし、アセチル化修飾された H3 ヒストンの量が増大したことを見出ししている。従って、紫外線処理により DNA メチル化修飾に非依存的な転写抑制関連の遺伝子の機能が損傷した事により、外来遺伝子の転写が向上したことがある可能性を示した。また、得られた変異株では、外来遺伝子のゲノム上の挿入位置に関わらず高度な発

現が起こることを Western 法により，確認している。

得られた株の生育は，野生型に比べて極わずかに遅い事を除いて良好である。この株は，これまでに報告された中では，最も外来遺伝子の高度な発現を可能にしており，細胞工場としての利用が期待される。

2.審査の経過と結果

- (1) 平成28年7月6日 博士後期課程委員会で学位論文の受理を決定し、6名がその審査委員として指名された。
- (2) 平成28年8月24日 公開論文審査発表会及び最終試験を実施した。
- (3) 平成28年9月5日 博士後期課程委員会で学位授与を可とし、教育研究審議会で承認された。